

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 25 日 (25.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/024175 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 38/00, 9/107, A61P 35/00, 35/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011675

(22) 国際出願日: 2003 年 9 月 12 日 (12.09.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-266876 2002 年 9 月 12 日 (12.09.2002) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒562-0036 大阪府箕面市船場西 2-19-30 Osaka (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 I M P ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

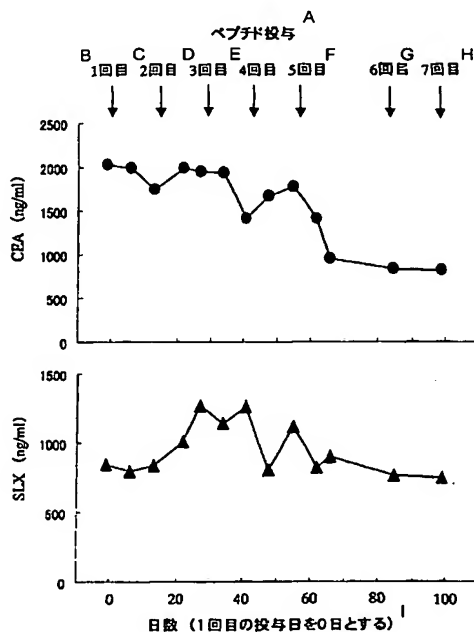
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

/ 続葉有 /

(54) Title: CANCER ANTIGEN PEPTIDE PREPARATION

(54) 発明の名称: 癌抗原ペプチド製剤



A...ADMINISTRATION OF PEPTIDE

B...1ST

C...2ND

D...3RD

E...4TH

F...5TH

G...6TH

H...7TH

I...TIME (DAYS) AFTER ADMINISTRATION

(THE 1ST ADMINISTRATION DAY BEING REFERRED AS TO DAY 0)

(57) Abstract: It is intended to provide WT1-origin cancer antigen peptides which are useful *in vivo*, in particular, in the clinical field and an administration dosage form of these cancer antigen peptides as a vaccine for cancer. Namely, a water-in-oil type emulsion containing, as the active ingredient(s), one or both of a peptide having the amino acid sequence Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO:2) and another peptide having the amino acid sequence Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO:3), and a process for producing the same.

(57) 要約: イン・ビボにて、特に臨床上有用なWT1由来の癌抗原ペプチドおよび当該癌抗原ペプチドの癌ワクチンとしての投与剤型を提供する。 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 2) もしくは Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号: 3) のアミノ酸配列を有するペプチドまたはその両方のペプチドを有効成分として含む油中水型エマルションおよびその製造方法に関する。

WQ 2004/024175 A1



OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明 細 書

癌抗原ペプチド製剤

5 技術分野

本発明は、H L A - A 2 4 拘束性癌抗原ペプチドを含有する製剤に関する。詳細には、種々の癌に対するワクチンとして使用されるエマルジョン製剤およびそれを調製するためのキットに関する。

10 背景技術

生体による癌細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性T細胞（以下、C T L と称する）が重要な働きをしている。C T L は、癌細胞上の癌抗原タンパク質由来の抗原ペプチド（癌抗原ペプチド）とM H C

（Major Histocompatibility Complex）クラス I 抗原（ヒトの場合はH L A 抗原と称する）とにより形成される複合体を認識し、癌細胞を攻撃・破壊する。

癌抗原タンパク質は、Immunity, vol. 10:281, 1999の表中に記載のものが代表例として挙げられる。具体的には、メラノサイト組織特異的タンパク質である g p 1 0 0 （J. Exp. Med., 179:1005, 1994）、M A R T - 1 （Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3515, 1994）、およびチロシナーゼ（J. Exp. Med., 178:489, 1993）などのメラノソーム抗原、ならびにメラノーマ以外の癌抗原タンパク質としてH E R 2 / n e u （J. Exp. Med., 181:2109, 1995）、C E A （J. Natl. Cancer. Inst., 87:982, 1995）、およびP S A （J. Natl. Cancer. Inst., 89:293, 1997）などの癌マーカーがある。癌抗原ペプチドは、癌抗原タンパク質が細胞内プロテアーゼによりプロセシングされて生成される約 8 から 1 1 個のアミノ酸から成るペプチドである（Cur. Opin, Immunol., 5:709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5:719, 1993; Cell, 82:13, 1995; Immunol. Rev., 146:167, 1995）。前記のように、この生成された癌抗原ペプチドとM H C クラス I 抗原（H L A 抗原）との複合体が細胞表面に提示され、C T L により認識される。従って、C T L による癌細胞破壊を利用する癌免疫療法剤（癌ワクチン）を開発する場合、C T L を効率良く

誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タンパク質から同定することが、非常に重要となる。

MHCクラス I 抗原分子には多くのサブタイプが存在し、個々のタイプに結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはMHC抗原分子のタイプに応じて規則性（結合モチーフ）が存在する。例えば、HLA-A 2に対する抗原ペプチドの結合モチーフは、2番目のアミノ酸がロイシン、メチオニンまたはイソロイシン、9番目のアミノ酸がバリン、ロイシンまたはイソロイシンである。またHLA-A 24に対する抗原ペプチドの結合モチーフは、2番目のアミノ酸がチロシン、フェニルアラニン、メチオニンまたはトリプトファン、9番目のアミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンである。また最近では、前記モチーフを含むHLA抗原への推定結合配列をデータベース上で検索することも可能である（例えばBIMASソフト (http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)）。従って、CTLを誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タンパク質より同定するには、第一に、癌抗原タンパク質のアミノ酸配列より目的のHLAタイプの結合モチーフまたは推定結合配列に一致する約8から11個のアミノ酸より構成されるペプチド領域を特定する。

しかしながら、結合モチーフや推定結合配列より同定されたペプチドが必ずCTL誘導活性を有するとは限らない。癌抗原ペプチドは癌抗原タンパク質が細胞内でプロセッシングされることにより生成されるため、プロセッシングにより生成されないペプチドは抗原ペプチドとはなり得ない。さらに、結合モチーフや推定結合配列を有するペプチドが実際に癌抗原ペプチドとして細胞内で生成されても、多くの癌抗原タンパク質は本来生体に存在する正常な物質であるため、CTLがこれら癌抗原に対してトレランスとなっている場合がある。以上のことから、CTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドを同定するためには、目的のHLAタイプの結合モチーフ・推定結合配列による予測のみでは不十分であり、イン・ビボでのCTL誘導活性の評価が重要となる。

Wilms 癌の癌抑制遺伝子WT1 (WT1 遺伝子) は、Wilms 癌、無紅彩、泌尿生殖異常、精神発達遅延などを合併するWAGR症候群の解析からWilms 癌の原因遺伝子の1つとして染色体11p13から単離され (Nature,

343:774, 1990)、そのゲノムDNAは約50kbであり10のエキソンから成り、そしてそのcDNAは約3kbである。cDNAから推定されるアミノ酸配列は、配列番号:1に示す通りである(Cell., 60:509, 1990)。WT1遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞をWT1アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される(特開平9-104627号公報)ことなどから、WT1遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT1遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており(特開平9-104627号公報、特開平11-35484号公報)、白血病および固形癌における新しい癌抗原タンパク質であることが判明した(J. Immunol., 164:1873-80, 2000、J. Clin. Immunol., 20, 195-202, 2000)。癌免疫療法(癌ワクチン)は多くの癌患者に対して適用可能であることが好ましいことから、多くの癌種で高発現しているWT1における癌抗原ペプチドの同定、および当該癌抗原ペプチドを利用した癌ワクチンの開発は重要である。これに関し、W000/06602号公報およびW000/18795号公報には、WT1タンパク質の部分から成る幾つかの天然型の癌抗原ペプチドが記載されているが、イン・ビボでの効果は知られていない。

発明の開示

本発明の目的は、イン・ビボ、特に臨床上有用なWT1由来の癌抗原ペプチドおよび当該癌抗原ペプチドの癌ワクチンとしての投与剤型を提供することにある。

本発明者らは、大阪大学医学部医学倫理委員会の承認を受け、患者のインフォームドコンセントを取得した上で臨床研究を実施したところ、特定の癌抗原ペプチドを特定の投与剤型と組み合わせることにより癌患者の病態の改善に有効であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、

(1) Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号:2) もしくは Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号:3) のアミノ酸配列を有するペプチドまたはその両方のペプチドを有効成分として含有する油中水型エマルジョン; 具体的には、前記ペプチド0.1~100mgを含む単位投与剤型である本

発明エマルション；好ましくは癌ワクチンとして使用される本発明エマルション；

(2) 配列番号：2もしくは配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチドまたはその両方、を含有する調製物と乳化剤および油状物質とを混合することを特徴とする、本発明の油中水型エマルションの製造方法；および

(3) 配列番号：2もしくは配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチドまたはその両方のペプチドを含む容器、および乳化剤と油状物質とを含む容器を含有する、本発明の油中水型エマルション調製用キット；好ましくは用時調製に用いられる本発明キット、に関する。

図面の簡単な説明

図1は、WT1野生型ペプチド（配列番号：2）投与前後の肺癌患者（女性）における腫瘍マーカー値の推移を示すグラフである。

図2は、WT1野生型ペプチド（配列番号：2）投与前後の肺癌患者（男性）における腫瘍マーカー値の推移を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

(1) 有効成分

本発明の油中水型エマルションに有効成分として含まれる配列番号：2または配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチドは、ヒトWT1（Cell., 60:509, 1990、NCBIデータベースAccession No. XP_034418、配列番号：1）に由来する。具体的にはヒトWT1の第235位から第243位の部分ペプチドである配列番号：2のアミノ酸配列を有するペプチド（W000/06602）、および当該第235位から第243位のうち第236位のMetをTyrに改変した配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチド（W002/079253（国際公開日：2002年10月10日））である。

本発明におけるペプチドが抗原提示細胞に提示され、イン・ビボにてHLA-A24抗原拘束性にCTLを誘導するという特性を有することが、本発明者らによる臨床試験により初めて見出された。当該特性は、癌患者にて上昇している腫瘍マーカーの血中濃度を、ペプチド投与後の所定期間に測定すること、またはH

LAテトラマー法 (Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002)) によりCTLの数を測定すること、により調べることができる。

前記ペプチドは、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ (The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善 (株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善 (株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

前記ペプチドは、配列番号: 2または3のアミノ酸配列において、N末端アミノ酸のアミノ基またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドであってもよい。

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1~3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられる。アシル基の具体例としては炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

C末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾しているペプチドとしては、例えばエステル体およびアミド体が挙げられ、エステル体の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエステル、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエステル、炭素数5から7のシクロアルキルエステル等が挙げられ、アミド体の具体例としては、アミド、炭素数1から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基の1つまたは2つで置換されたアミド、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド等が挙げられる。

(2) 油中水型エマルション

本発明において、油中水型エマルションとは、油が分散媒であり水が分散相として構成される、水が細かい滴として油中に分散されている乳剤を意味する。

本発明エマルションの調製には通常、乳化剤と油状物質とが用いられる。乳化剤は有効成分を油中に分散させる限り特に限定されないが、具体的にはポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（ポリソルベート20）、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート（ポリソルベート40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（ポリソルベート60）等が挙げられる。油状物質としては、ドラケオール6VR、スクワレン、オレイン酸エチル等を用いることができる。

Montanide ISA（登録商標）720、Montanide ISA（登録商標）51などは乳化剤および油状物質を共に適量含有しており、本発明において好適に使用できる。

本発明油中水型エマルションを調製するには、鈴木郁生ら、「医薬品の開発」15巻、製剤の物理化学的性質、廣川書店、平成元年10月、291-306頁などを参考にして行うことができる。例えば、まず、有効成分であるペプチドを蒸留水または生理食塩水に溶解または懸濁し、有効成分を含有する調製物を調製する。次いで、得られた調製物を上記説明した乳化剤および油状物質と混合する。混合はミキサー、ホモジナイザー、超音波攪拌装置などを用いて行うことができる。混合は、医療現場においても行うことができる。

有効成分と乳化剤および油状物質との混合割合は、油中水型エマルションが調製される範囲において当業者なら適宜設定することができる。代表的には、Montanide ISA（登録商標）51：有効成分＝50：50（w：w）およびMontanide ISA（登録商標）720：有効成分＝70：30（w：w）である。

本発明の油中水型エマルションは、前記いずれかのペプチドあるいはその両方のペプチドを有効成分として含むことができる。

本発明の油中水型エマルションは、前記ペプチド0.1～100mg、好ましくは0.1～20mgを含む単位投与剤型の製剤であることができる。この用量はイン・ビボにてHLA-A24抗原拘束性にCTLを誘導するに必要な量であり、1～10mgがより好ましい。具体的な用量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により前記範囲内で適宜調整することができる。

本発明の油中水型エマルションは癌ワクチンとして好適に使用される。当該癌ワクチンは癌の治療または予防に有効である。本発明における癌ワクチンの対象となる疾患は、WT 1 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、
5 肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌である。

このように、本発明は別の態様として、本発明の油中水型エマルションをHLA-A 2 4 陽性かつWT 1 陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

10 本発明エマルションの投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられ、CTLを効率よく誘導する皮内投与や皮下投与が好ましい。投与回数および投与間隔は、治療または予防目的の疾患、患者の個体差により適宜調整することができるが、通常複数回であり、数日ないし数月に1回、本発明の単位投与剤型を投与するのが好ましい。

15 (3) キット

本発明は他の態様として、配列番号：2もしくは配列番号：3のアミノ酸配列を有するペプチドまたはその両方のペプチドを含む容器、および乳化剤と油状物質とを含む容器を含有する、本発明の油中水型エマルション調製用キットに関する。

20 本発明キットにおける容器とはガラス製またはプラスチック製の封栓可能なバイアル等である。容器に含まれるペプチド、乳化剤および油状物質は前記の通りである。

ペプチドは通常、凍結乾燥品として容器に含まれる。この場合、本発明キットはさらに、適当濃度のペプチド溶液または懸濁液を調製する容量の滅菌水または
25 生理食塩水を含有する容器を含むことができる。あるいはペプチドは水溶液または懸濁液の状態で容器に含まれることもある。

ペプチドを含む容器および乳化剤や油状物質を含む容器には通常、それぞれ1回分の投与量が格納される。例えば、ペプチドは0.1～100mg、好ましくは1～20mgを1容器に、また乳化剤および油状物質は、用いるペプチドを油

中水型エマルジョンに調製するに必要とされる量を1容器に含有させる。

本発明キットを用いれば、本発明の油中水型エマルジョンが医療現場にて容易に用時調製することができる。

5 実施例

以下、製剤例および実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによりなんら限定されるものではない。実施例で示される臨床研究は、大阪大学医学部医学倫理委員会の承認を受け、患者のインフォームドコンセントを取得した上で実施されたものである。

10

実施例 1

WT1野生型ペプチド（配列番号：2）の肺癌患者に対する効果（1）

15

転移があるステージ I V の肺癌患者（女性）にWT1ペプチドワクチンを投与した症例について示す。WT1タンパク質の第235位から243位の部分ペプチドであり、HLA-A*2402分子に抗原提示され、ペプチド特異的なCTLを誘導することが確認されているWT1野生型ペプチド：Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）は、MPS社（米国）がGMPグレードで合成したものを使用した。

20

WT1野生型ペプチドの溶液を同重量のMontanide ISA（登録商標）51（SEPPIC社）と混合して油中水型エマルジョンを作製する。800mg（約1016 μ l）のMontanide ISA（登録商標）51に、1 mg/mlのペプチド溶液を800 μ l添加し、ビーカー内で21Gの針をつけた注射筒で溶液を10回出し入れして混合し、エマルジョンを調製した。

25

このようにして得られるエマルジョン680 μ l（ペプチド0.3mg）を投与直前にそれぞれ調製し、最初の投与日をday0とするとday0、14、28、42、56、85、99の計7回、上腕に皮内注射した。この患者の腫瘍マーカーCEAの血中濃度は、ペプチド投与の9ヶ月前には約400ng/mlであったが、その後急激に増加し、ペプチド投与の2ヶ月前には約2000ng/mlになっていた。

ペプチド投与前日からの腫瘍マーカー値の推移を図1に示す。腫瘍マーカーの値は、CEA（癌胎児性抗原）についてはダイナボット社のIMxCEAダイナパックを

用いて測定し、SLX（シアリルLex-i抗原）については住金バイオサイエンス社に委託して測定した。

図1は、ペプチド投与後はCEAの血中濃度増加が抑えられ、投与5回目以降は著しく血中濃度が低下したことを示している。また、SLXの血中濃度については、
5 ペプチド投与4回目までは増加傾向であったが、それ以降は増加が抑えられ、血中濃度が低下して安定化の状態になったことを示している。

投与したペプチドに対する特異的な免疫反応の指標として遅延型皮内反応（DTH）を測定したところ、投与5回目では、投与48時間後のペプチド投与部位に強い腫脹が認められ、特異的な免疫が成立していることが示唆された。

10 また、ELISPOT法（J. Immunol. Meth., 110:29, 1988）により、末梢血単核球（PBMC）中に投与したペプチドに特異的に反応してIFN- γ を産生するT細胞を検出したところ、ペプチド投与後のPBMCではペプチド投与前のPBMCと比較して、多量のIFN- γ を産生するT細胞が多く認められ、特異的な免疫が成立していることが示唆された。

15 これらの結果より、WT1野生型ペプチド（配列番号：2）の油中水型エマルションの投与により、腫瘍の進展が抑制されていることが示唆された。

実施例2

WT1野生型ペプチド（配列番号：2）の肺癌患者に対する効果（2）

20 転移があるステージIVの肺癌患者（男性）にWT1ペプチドワクチンを投与した症例について示す。実施例1と同様にWT1野生型ペプチド（配列番号：2）とMontanide ISA（登録商標）51を混合して油中水型エマルションを投与直前にそれぞれ作製し、最初の投与日をday0とすると、day0、14、28、42、56、71の計6回、上腕に皮内投与した。

25 ペプチド投与前後の腫瘍マーカー値の推移を図2に示す。腫瘍マーカーの値は、CEAとSLXについては、実施例1と同様に測定し、CYFRA（サイトケラチン19フラグメント）についてはロッシュ社のエクルーシスCYFRAを用いて測定した。

図2は、SLXの血中濃度についてはペプチド投与前は正常値上限の38U/mlよりも高い50U/mlであったが、ペプチド投与2回目以降は、正常値の範囲にまで減少

したことを示している。CYFRAの血中濃度についても、ペプチド投与前は正常値上限の2ng/mlよりも高値であったが、ペプチド投与3回目以降は、正常値上限値以下になることが示された。また、CEAの血中濃度については、正常値上限の5ng/ml以上ではあるが、ペプチド投与2回目以降はペプチド投与前よりも値が低下していることが示された。

これらの結果より、WT1野生型ペプチド（配列番号：2）の油中水型エマルシヨンの投与により腫瘍の進展が抑制されていることが示唆された。

実施例 3

WT1改変ペプチド（配列番号：3）の白血病患者に対する効果

骨髓異形成症候群（MDS）から転化した低形成性白血病（AML-M1）の癌患者（男性）にWT1ペプチドワクチンを投与した症例について示す。WT1改変ペプチド：Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）は、MPS社（米国）がGMPグレードで合成したものを使用した。実施例1と同様にMontanide ISA（登録商標）51と混合して油中水型エマルシヨンを作製し、患者の上腕に皮内投与した。投与2日前の骨髓中の白血病芽球は50%であり、投与前日の総白血球数は1500/ μ lであったが、投与2日後には総白血球数が700/ μ lまで減少し、骨髓中の白血病芽球は27%に減少した。総白血球数が減少したため、造血因子のG-CSFを投与したところ投与7日後には2150/ μ lまで回復し、骨髓中の白血病芽球は11%であった。

この結果より、WT1改変ペプチド（配列番号：3）の油中水型エマルシヨンの投与により、骨髓中の白血病芽細胞の割合が減少し白血病の症状が改善されることが示された。

次に、同じ患者における、WT1野生型ペプチドを提示したHLA-A*2402分子に反応する細胞傷害性T細胞（CTL）の数をHLAテトラマー法により測定した。HLA-A*2402テトラマーは、Int. J. Cancer: 100, 565-570（2002）に記載の方法でWT1野生型ペプチドを用いて作製した。フローサイトメーターのFACSによりPE標識のHLA-A*2402テトラマーとFITC標識CD8抗体との2カラーで染色し、ダブルポジティブの細胞をWT1野生型ペプチドを認識するCTL、すなわちWT1陽性の癌細胞に

反応するCTLとした。ペプチド投与3日前のCTL頻度は1.1%であったが、投与の2日後には、8.8%にまで増加していた。

この結果より、WT1ペプチドワクチンの投与によりWT1陽性の癌細胞に反応性CTLが急激に増加していることが明らかになった。さらに、このCTLが白血病芽細胞を傷害することにより骨髓中の白血病芽細胞の割合が減少した可能性が示唆された。

産業上の利用分野

本発明により、臨床試験においてCTL誘導活性を有するWT 1由来のHLA-A 24拘束性ペプチドを有効成分とする油中水型エマルジョン、それを調製するためのキットが提供される。本発明は、多くの癌患者の病態改善に有効であると考えられる。

請 求 の 範 囲

1. Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2) もしくはCys Tyr
Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3) のアミノ酸配列を有するペプチ
ドまたはその両方のペプチドを有効成分として含有する油中水型エマルション。

5

2. 前記ペプチド0.1～100mgを含む単位投与剤型である請求項1記載
のエマルション。

3. 癌ワクチンとして使用される請求項1または2記載のエマルション。

4. Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2) もしくはCys Tyr
Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3) のアミノ酸配列を有するペプチ
ドまたはその両方、を含有する調製物と乳化剤および油状物質とを混合すること
を特徴とする、請求項1記載の油中水型エマルションの製造方法。

10

5. Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2) もしくはCys Tyr
Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3) のアミノ酸配列を有するペプチ
ドまたはその両方のペプチドを含む容器、および乳化剤と油状物質とを含む容器
を含有する、請求項1記載の油中水型エマルション調製用キット。

15

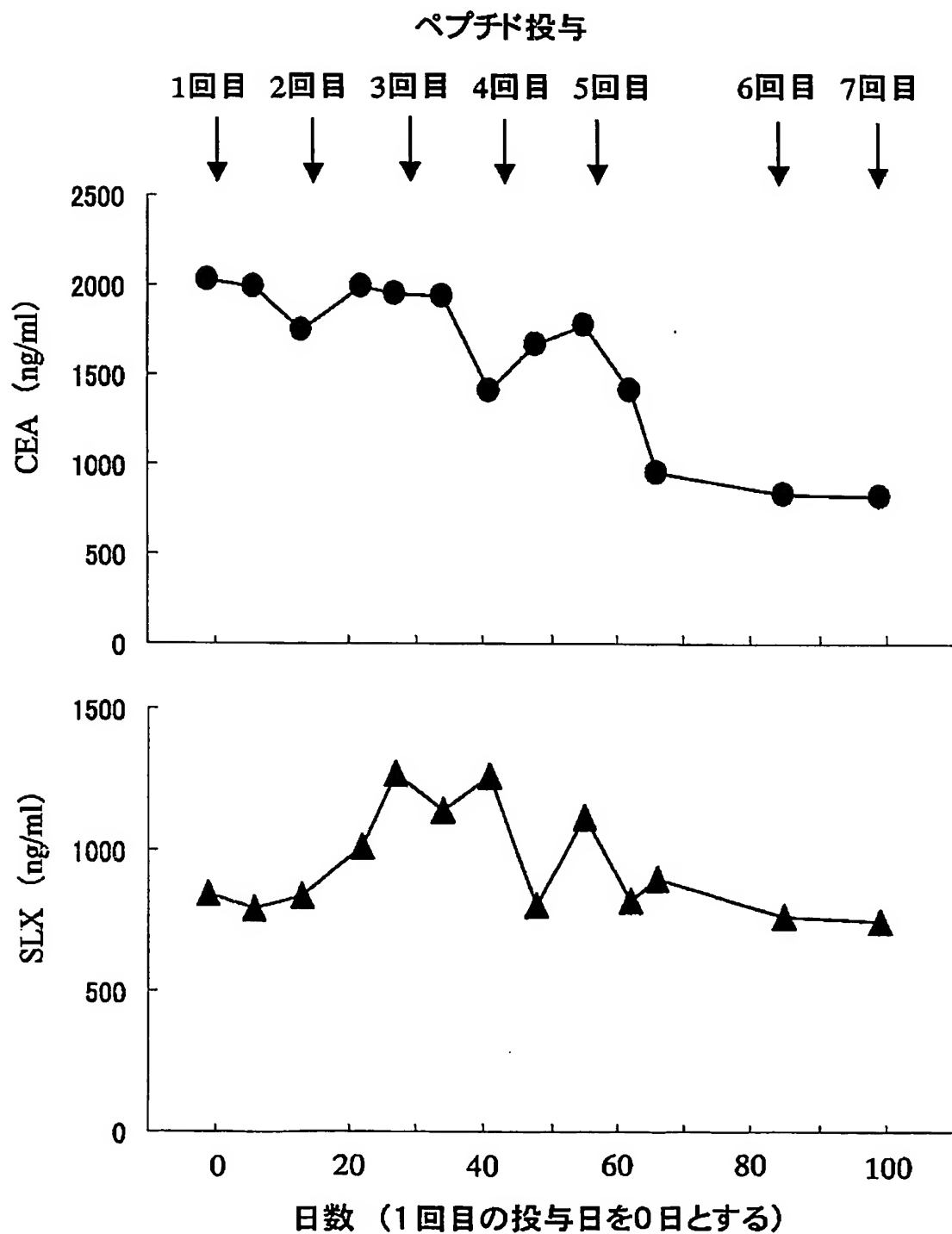
6. 請求項1記載の油中水型エマルションの用時調製に用いられる請求項6記
載のキット。

7. HLA-A24陽性かつWT1陽性の癌患者に請求項1記載の油中水型エ
マルションを投与する、該患者における癌を治療または予防するための方法。

20

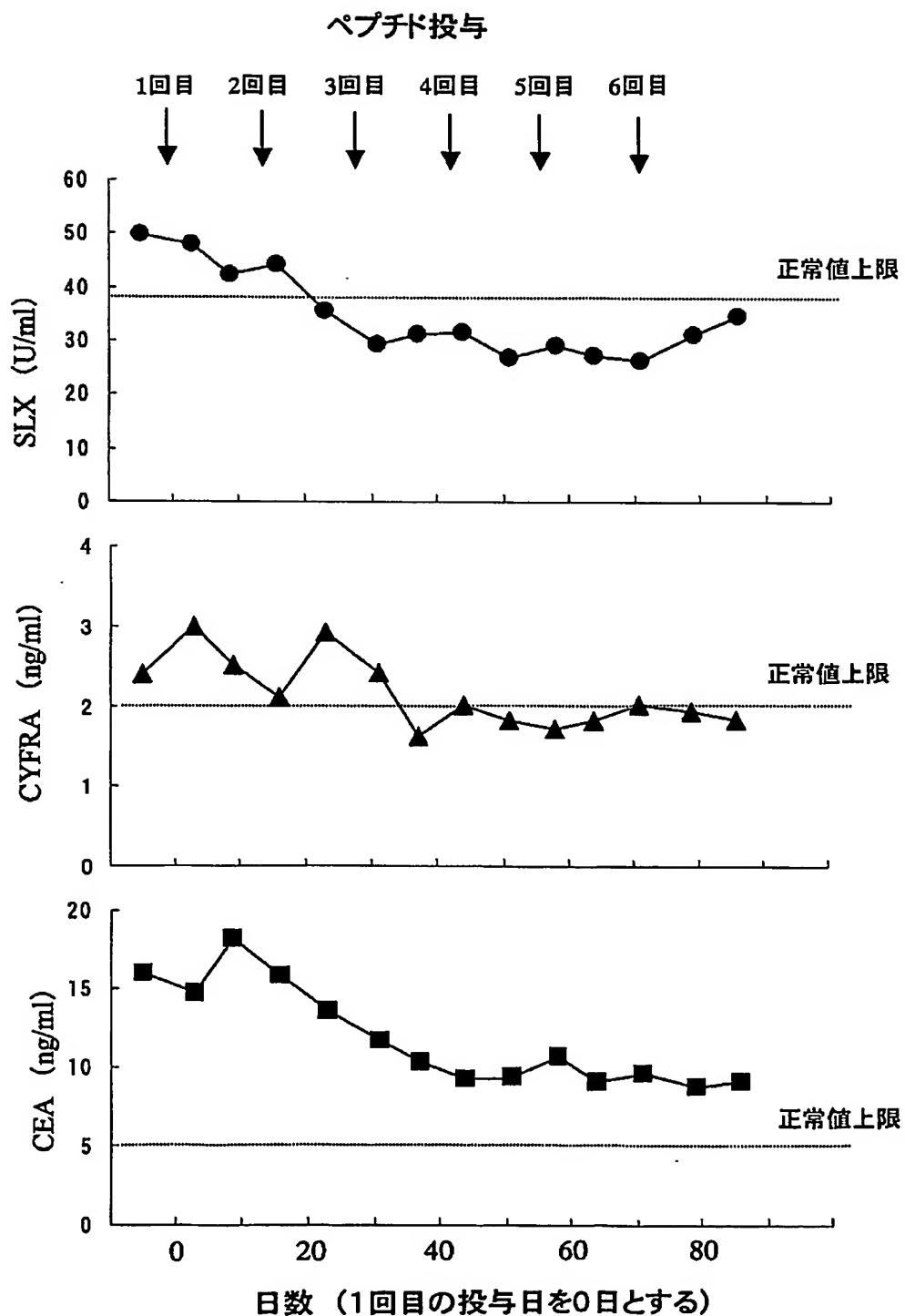
1/2

図 1



2/2

図 2



SEQUENCE LISTING

<110> Haruo Sugiyama

<120> Formulations comprising a tumor antigen peptide

<130> 663970

<140>

<141> 2003-09-12

<150> JP 2002-266876

<151> 2002-09-12

<160> 3

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile

2/3

130	135	140
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr		
145	150	155 160
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe		
	165	170 175
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln		
	180	185 190
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser		
	195	200 205
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp		
	210	215 220
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln		
	225	230 235 240
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser		
	245	250 255
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu		
	260	265 270
Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile		
	275	280 285
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro		
	290	295 300
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys		
	305	310 315 320
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys		
	325	330 335
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro		
	340	345 350
Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp		
	355	360 365
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln		
	370	375 380
Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr		

3/3

385 390 395 400
His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11675

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/00, 9/107, A61P35/00, 35/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/00, 9/107, A61P35/00, 35/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/18795 A (Corixa Corp.), 06 April, 2000 (06.04.00), Full text & AU 9964078 A & EP 1117687 A & JP 2002-525099 A	1-6
A	WO 00/06602 A1 (Haruo SUGIYAMA), 10 February, 2000 (10.02.00), Full text & AU 9949321 A & EP 1103564 A & JP 2000-562398 A	1-6
A	WO 02/079253 A1 (Haruo SUGIYAMA), 10 October, 2002 (10.10.02), Full text (Family: none)	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 November, 2003 (10.11.03)

Date of mailing of the international search report
25 November, 2003 (25.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11675

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 7 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A 6 1 K 3 8 / 0 0, 9 / 1 0 7, A 6 1 P 3 5 / 0 0, 3 5 / 0 2

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A 6 1 K 3 8 / 0 0, 9 / 1 0 7, A 6 1 P 3 5 / 0 0, 3 5 / 0 2

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 00/18795 A (コリクサ コーポレイション) 2000. 04. 06, 全文 &AU 9964078 A &EP 1117687 A &JP 2002-525099 A	1-6
A	WO 00/06602 A1 (杉山治夫) 2000. 02. 10, 全文 &AU 9949321 A &EP 1103564 A &JP 2000-562398 A	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 11. 03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子



4 C

9 2 6 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 02/079253 A1 (杉山治夫) 2002. 10. 10, 全文 (ファミリーなし)	1 - 6

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲7に記載のものは、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。